

L21 ANSWER 2 OF 65 CA COPYRIGHT 2001 ACS

AN 130:248732 CA

TI Determination of double-stranded nucleic acids-cleaving enzyme activities by fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis

IN Hirano, Kenichi; Jibu, Masaki

PA Hamamatsu Photonics K. K., Japan

SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 9 pp.

PI JP 11056398 A2 19990302 JP 1997-216388 19970811

AB Described is a method to det. the double-stranded nucleic acid enzyme activity by FRET, where a nucleic acid capable of forming intermol. duplex labeled with an energy donor (e.g. fluorescein) and an energy acceptor (e.g. rhodamine X) at both ends, resp., is used as a substrate. The increase of fluorescence resulted in the enzymic digestion of the nucleic acid substrate can be obsd. by fluorometry. The method was demonstrated by digestion with restriction endonucleases HindIII and PvuII and their resp. substrates.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-56398

(43) 公開日 平成11年(1999) 3月2日

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 21/76

21/78

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 21/76

21/78

Z N A A

C

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号

特願平9-216388

(22) 出願日

平成9年(1997) 8月11日

(71) 出願人 000236436

浜松ホトニクス株式会社

静岡県浜松市市野町1126番地の1

(72) 発明者 平野 憲一

静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホ  
トニクス株式会社内

(72) 発明者 治部 雅貴

静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホ  
トニクス株式会社内

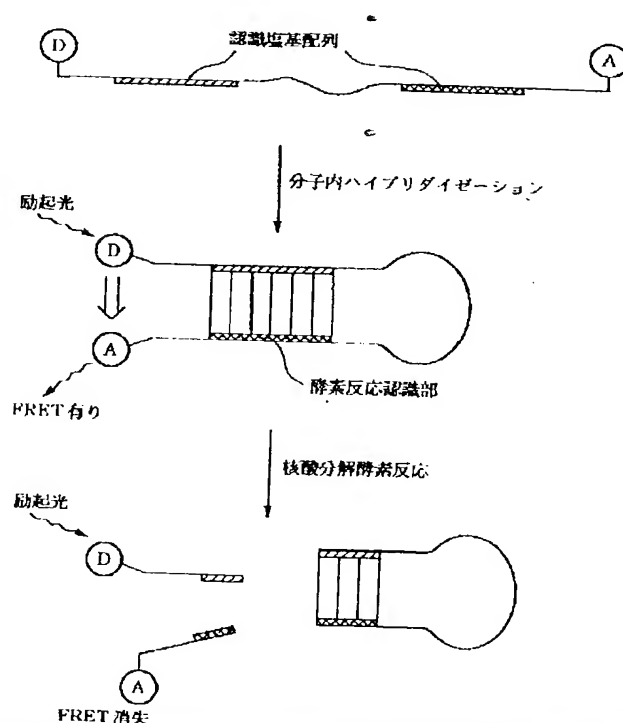
(74) 代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外4名)

(54) 【発明の名称】 二本鎖核酸分解酵素活性の測定方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、二本鎖核酸分解酵素活性の測定方法を提供する。

【解決手段】 本発明に係る方法は、(1) 分子内に、二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部とを有し、かつ両端に、エネルギー供与体と、エネルギー受容体とを有する1本鎖プローブを調整し、(2) 分子内で、前記認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部とをハイブリダイズさせてハイブリダイズ体を形成し、(3) 前記エネルギー供与体の光励起による前記プローブの蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく蛍光スペクトルの、前記ハイブリダイズ体の前記核酸分解酵素反応による分解による変化を測定することを特徴とするものである。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) 分子内に、塩基配列特異的な二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部とを有し、かつ両端に、エネルギー供与体と、エネルギー受容体とを有する1本鎖プローブを調整し、(2) 分子内で、前記認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部とをハイブリダイズさせて分子内2本鎖構造を形成し、(3) 前記エネルギー供与体の光励起による前記プローブの蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に基づく蛍光スペクトルの、前記分子内2本鎖構造の前記核酸分解酵素反応による分解による変化を測定することを特徴とする二本鎖核酸分解酵素活性の測定方法。

【請求項2】 (1) 分子内に、塩基配列特異的な第1の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部と、第2の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部とを有し、かつ両端に、エネルギー供与体と、エネルギー受容体とを有する1本鎖プローブを調整し、(2) 分子内で、前記第1の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と前記相補的な認識塩基配列部とハイブリダイズさせ、前記第2の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と前記相補的な塩基配列部とハイブリダイズさせて分子内2本鎖構造を形成し、(3) 前記エネルギー供与体の光励起による前記プローブの蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に基づく蛍光スペクトルの、前記プローブの前記第1の核酸分解酵素反応又は前記第2の核酸分解酵素反応による分解による変化を測定することを特徴とする二本鎖核酸分解酵素活性の測定方法。

【請求項3】 (1) 分子内に、塩基配列特異的な第1の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部と、第2の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部と、第3の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部とを有し、かつ両端に、エネルギー供与体と、エネルギー受容体とを有する1本鎖プローブを調整し、(2) 分子内で、前記第1の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と前記相補的な認識塩基配列部とハイブリダイズさせ、前記第2の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と前記相補的な塩基配列部とハイブリダイズさせ、前記第3の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と前記相補的な塩基配列部とハイブリダイズさせて分子内2本鎖構造を形成し、(3) 前記エネルギー供与体の光励起による前記プローブの蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に基づく蛍光スペクトルの、前記プローブの前記第1の核酸分解酵素反応又は前記第2の核酸分解酵素反応又は前記第3の核酸分解酵素反応による分解による変化を測定することを特徴とする二本鎖核酸分解酵素活性の測定方法。

【請求項4】 (1) 前記二本鎖核酸分解酵素の認識塩

基配列部が、前記二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列と、前記認識配列の両側にさらに2〜5個の塩基を有することを特徴とする請求項1〜3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 前記エネルギー供与体がフルオレセイン系発光基団を含み、前記エネルギー受容体が7-デキシル系発光基団を含むことを特徴とする請求項1〜4のいずれか1項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸分解酵素、特に塩基配列特異的な二本鎖核酸分解酵素の活性を測定する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】核酸分解酵素の活性を測定する方法において、2種類の蛍光色素でラベル化されたプローブを用いて、蛍光色素間の蛍光共鳴エネルギー移動(fluorescence resonance energy transfer,以下FRETという)現象に基づく測定方法が知られている(S.S.Ghosh, P.S.Eis, K.Blumeyer, K.Fearon, and D.P.Millar (1994), Nucleic Acids Res., 22, 3155-3159)。この方法においては、図1に示したように蛍光エネルギーのドナー色素(以下Dとする)を結合したオリゴヌクレオチドプローブと、さらに蛍光エネルギーのアクセプター色素(以下Aとする)を結合したオリゴヌクレオチドプローブとを、ハイブリダイズさせたハイブリダイズ体(二本鎖)であって、かつ被測定核酸分解酵素(二本鎖核酸分解酵素)に特定の認識塩基配列をその一部に有するものである。係るハイブリダイズ体は、それぞれの末端に結合したD及びA間でFRET現象が生じ、特有の蛍光スペクトルを与える。さらに、核酸分解酵素により特定の部位が切断された後は、上記のFRET現象は失われ、上記特有の蛍光スペクトルが消失することとなる。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記説明した2種類のオリゴヌクレオチドを用いた1組のプローブによるFRET現象を利用した核酸分解活性の測定方法は、上記2種類のオリゴヌクレオチドが測定溶液中で正確に同数存在し、かつハイブリダイズ体形成していることが必要である。すなわち、測定溶液中に他の一本鎖核酸と結合可能な蛋白質等が混在する場合や、ハイブリダイズ条件の変化等により、測定溶液中にどちらか一方のプローブがハイブリダイズせずにそのまま存在することか有り得る。この場合には、係るハイブリダイズしていないプローブからの蛍光が測定バックグラウンド蛍光となり、FRET現象を利用した核酸分解酵素活性の測定が困難となるという問題点がある。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】そこで本発明者等は、鋭意研究し、1種類の1本鎖オリゴヌクレオチドプローブ

を用いることで上記問題点のない新規な核酸分解酵素活性測定法を見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明に係る核酸分解酵素の活性の測定法で用いるプローブは、図2に示されるように、1種類の1本鎖オリゴヌクレオチドプローブであって、少なくとも、(1)FRET現象を利用するための1組のD及びAを該オリゴヌクレオチドの末端部に有し、かつ(2)該プローブが分子内で2本鎖構造を形成する際に、被測定核酸分解酵素の酵素反応認識部としての塩基配列部を形成するような特定の塩基配列を有するものである。さらに、(3)係るD及びAは、該プローブが分子内で2本鎖構造を形成する際にはDからAへのFRETが可能となるような空間位置をとりうるものである。

【0006】分子内でハイブリダイズ体を形成した上記構造を有するプローブは、被測定核酸分解酵素反応により、上記の特定の酵素反応認識部で切断された場合は、図2に示されるように、D又はAが結合している切断された部分はもはや十分ハイブリダイズできず、溶液中に遊離する。従って、FRET現象は消失することとなる。

【0007】上記の核酸分解酵素反応の溶液の蛍光スペクトルは図3に示されるように、該酵素処理前はDに基づく蛍光は、FRETによりほとんど観測されないが、該酵素処理によりFRET現象が消失した後は、Dに基づく蛍光が大きく観測されることとなり、核酸分解酵素の反応性を測定することが可能となる。

【0008】すなわち、本発明は、(1) 分子内に、二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部とを有し、かつ両端に、エネルギー供与体と、エネルギー受容体とを有する1本鎖プローブを調整し、(2) 分子内で、前記認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部とをハイブリダイズさせて分子内2本鎖構造を形成し、(3) 前記エネルギー供与体の光励起による前記プローブの蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に基づく蛍光スペクトルの、前記分子内2本鎖構造の前記核酸分解酵素反応による分解による変化を測定することを特徴とする二本鎖核酸分解酵素活性の測定方法を提供するものである。

【0009】また、本発明は、(1) 分子内に、第1の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部と、第2の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部とを有し、かつ両端に、エネルギー供与体と、エネルギー受容体とを有する1本鎖プローブを調整し、(2)

分子内で、前記第1の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と前記相補的な認識塩基配列部とハイブリダイズさせ、前記第2の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と前記相補的な塩基配列部とハイブリダイズさせて分子内2本鎖構造を形成し、(3) 前記エネルギー供与体の光励起による前記プローブの蛍光共鳴エネルギー移動

(FRET)に基づく蛍光スペクトルの、前記プローブの前記第1の核酸分解酵素反応又は前記第2の核酸分解酵素反応又は前記第3の核酸分解酵素反応による分解による変化を測定することを特徴とする二本鎖核酸分解酵素活性の測定方法を提供するものである。

【0010】さらに、本発明は、(1) 分子内に、第1の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部と、第2の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部と、第3の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と、前記塩基配列部と相補的な塩基配列部とを有し、かつ両端に、エネルギー供与体と、エネルギー受容体とを有する1本鎖プローブを調整し、(2) 分子内で、前記第1の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と前記相補的な認識塩基配列部とハイブリダイズさせ、前記第2の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と前記相補的な塩基配列部と分子内2本鎖構造ダイズさせ、前記第3の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と前記相補的な塩基配列部とハイブリダイズさせて分子内2本鎖構造を形成し、(3) 前記エネルギー供与体の光励起による前記プローブの蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に基づく蛍光スペクトルの、前記プローブの前記第1の核酸分解酵素反応又は前記第2の核酸分解酵素反応又は前記第3の核酸分解酵素反応による分解による変化を測定することを特徴とする二本鎖核酸分解酵素活性の測定方法を提供するものである。

【0011】また、上記いずれかの方法であって、さらに(1) 前記二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部が、前記二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部と、前記認識配列の両側にさらに2〜5個の塩基を有することを特徴とする方法を提供するものである。

【0012】また、上記エネルギー供与体がフルオレセイン系蛍光団を含み、前記エネルギー受容体がローダミン系蛍光団を含むことを特徴とする方法を提供するものである。

【0013】以下本発明をさらに詳しく説明する。

【0014】(蛍光共鳴エネルギー移動、FRET)本発明におけるFRET現象とは、蛍光に係わる現象であって(Stryer, L., Ann. Rev. Biochem. 47, 1978, 819-846;

Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture-Part B. Taylor, D.L. and Wang, Y. eds., Academic Press, New York, 220-245, 1989)、1つの発蛍光団(以下、エネルギー供与体、エネルギー供与体色素、エネルギードナー、ドナー、Dとする)の蛍光スペクトルが他の発蛍光団(エネルギー受容体、エネルギー受容体色素、エネルギーアクセプター、アクセプター、Aとする)の励起スペクトルと重なる場合かつドナーとアクセプターとが接近する位置にある場合においては、ドナーの励起がアクセプターからの蛍光を誘導し、さらにドナー自身からの蛍光強度は減少するという現象を意味す

る。

【0015】FRETはドナーとアクセプターとの距離に極めて敏感であることが知られており、一般的には両者の距離の $10^6$ 乗に比例する。

【0016】また、係るFRET現象は、種々の生物、細胞生物学研究に利用されている（例えば、ハマーヘッドリボザイム(Hammerhead ribozyme)の溶液中での構造研究、cAMPの生体中での濃度研究、膜融合、レトロウイルスプロテアーゼ、核酸構造と塩基配列、そして細胞内オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション等)ものと同じ現象である。

【0017】(エネルギー供与体(ドナー)、D; エネルギー受容体(アクセプター)、A) 本発明において使用可能なエネルギー供与体(ドナー)およびエネルギー受容体(アクセプター)は、FRETを利用することが可能な組合わせならば特に制限されない。

【0018】種々の発蛍光団を有する色素が使用可能であるが、例えばフルオレセイン系、ローダミン系の色素等が好適に使用可能である。

【0019】本発明においては特に、ドナーとしてフルオレセイン発蛍光団を有する色素、およびアクセプターとしてローダミンX発蛍光団を有する色素を用いることが好ましい。

【0020】フルオレセインおよびローダミンXの吸収スペクトルは吸収ピークとして497、586nmを有する。

【0021】一方フルオレセインは494nmで励起した場合に523nmに蛍光のピークを示す。またローダミンXは585nmで励起した場合に610nmに蛍光ピークを示す。

【0022】ここでこの2種類の発蛍光団がFRETを生じるに十分な距離にある場合には、ドナーとしてのフルオレセインからアクセプターとしてのローダミンXへの蛍光エネルギー移動に伴いフルオレセインに基づく蛍光強度は減少し、ローダミンXに基づく蛍光強度が増加することになる。

【0023】(プローブ) 本発明に係る方法において使用可能な1本鎖プローブは、その一例が図2に模式的に示されるように、少なくとも両端にFRET現象を利用するためのD及びAを結合したものであって、さらに、二本鎖核酸分解酵素を認識するための塩基配列と、それに相補的な認識塩基配列を分子内に有するものである。係るプローブは通常のハイブリダイズ条件により、上記認識塩基配列とその相補的な塩基配列が分子内でハイブリダイズして分子内2本鎖構造を形成し、分子はヘアピン構造に類似の構造を有するものとなる(図2)。従って、プローブの両末端に結合したD及びAは、その空間位置が接近し、FRET現象を生じるに十分な位置となる。この場合、Dに対して光励起すると、その励起エネルギーが共鳴的にAに移動して特徴的な蛍光スペクトル

を与えることとなる。

【0024】このFRETに基づく蛍光スペクトルの変化を模式的に表したものが図3である。FRET現象が生じている場合は、Dの光励起に基づくDからの蛍光はほとんど観測されない。一方、FRET現象が消失した場合には、Dの光励起に基づきDからの強い蛍光が起こり、大きな蛍光スペクトル変化として観測されることとなる。係る蛍光スペクトルの変化により、被検核酸分解酵素の存在を確認することが可能となるものである。

10 【0025】すなわち、図2に示されるように、本発明に係るプローブを、二本鎖核酸分解酵素と反応させることにより、プローブ中の前記認識配列部で切断(分解)が生じる。この分解が生じた後は、D及びAが結合したオリゴヌクレオチドはもはやハイブリダイズ体を保持するには十分な塩基対数を持たず溶液中に遊離する。その結果、上記のFRET現象が消失し、蛍光スペクトルに大きな変化を与えることとなる(図3)。

【0026】また、本発明に係るプローブは、溶液中で十分に低濃度の条件で、かつ適当な温度条件の下で分子内ハイブリダイズさせることにより、前記認識配列部で分子内ハイブリダイズしたヘアピン構造を有するもののみを得ることが可能である。前記認識配列部には、二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列のみならず、その両端にさらにいくつかの塩基対を有することも好ましい態様である。すなわち、前記酵素がその酵素反応を行うために必要ないくつかの余分の塩基対をさらに有する構造である。その数は被検核酸分解酵素にもよるが、通常2〜5個の塩基対があることが好ましい。

30 【0027】さらに、本発明に係るプローブのDまたはAと前記認識配列部の間の構造(スパーサー部)についても特に制限はなく、種々の化学構造のものが可能であるが、上記ヘアピン構造を有する場合に塩基対を形成してプローブを安定化する目的で塩基対であることが好ましい。また、塩基対である場合には、その塩基対数がありに多いと、前記酵素反応により該プローブがその酵素反応認識部で分解した後であっても十分安定にハイブリダイズ体が存在し、FRETの消失が見られないこととなり好ましくない。従って、その塩基数は、核酸分解酵素により分解された場合のそれぞれの断片に残る塩基対によっては2本鎖を保持することができない程度の数を選択することが好ましい。この数は温度、塩基内の種類(GC含量)によって異なるが、通常公知の方法により選択することは容易である(PCR: Clinical Diagnostics and Research, A. Rolfs, I. Schuller, U. Finckh, I. Weber Rolfs eds., p.11 Springer Laboratory(1992)). 具体的には、通常の温度条件(25-40℃)では、15塩基以下であることが好ましい。本発明に係るプローブは分子内で2本鎖構造を形成した後はヘアピン構造を有するが、このためには前記認識配列部及びその相補的な塩基配列部間の分子の長さがあまりに短いと十分な

アピン構造がとれないこととなり好ましくない。従って、安定なヘアピン構造を保持するためには、少なくとも核酸塩基に換算して1個以上の長さ、好ましくは3個以上の長さ前記認識配列に隣接していることが必要である。

【0028】(1本鎖プローブも他の例)上記説明したように、本発明に係るプローブの構造は、前記酵素反応認識部が1カ所である必要はなく、同一分子内に複数の酵素反応認識部を設けることが可能である。具体的には、図4(A)及び図4(B)に、本発明のプローブの他の例について模式的に表されているように、2個又は3個の酵素反応認識部を有するプローブの調整が可能となる。係るプローブを用いると、複数の種類の二本鎖核酸分解酵素の活性を測定することが可能となるものである。すなわち、複数の二本鎖核酸分解酵素認識塩基配列部を有するものであるから、分子内ハイブリダイズにより、複数のヘアピン構造を有するプローブとなる(図4(A)、(B))。この場合、プローブが核酸分解酵素により分解されるとFRETに基づく現象が消失することとなる。

【0029】図5には、3種類の二本鎖核酸分解酵素のいずれかの活性が同時に検出可能なプローブとその作用を模式的に示した。3種類(それぞれ1、2、3とする)の二本鎖核酸分解酵素の認識塩基配列部を有するプローブに、それぞれの酵素1、2、3が反応して分解切断した場合のFRETが消失することを示す。

【0030】(1本鎖プローブの調整方法)本発明において、DおよびAをオリゴヌクレオチド5'または3'末端に結合する方法においては特に制限されず、一般の有機合成法、または適当な誘導体を用いて酵素反応により合成可能である。

【0031】本発明においては、5'末端にフルオレセイン発光団を有するオリゴヌクレオチドに、ローダミンX発光団を有するヌクレオチド又はローダミン発光団を化学合成法で、または酵素反応で結合し合成可能である。

【0032】同様に本発明においては、3'末端にローダミンX発光団を有するオリゴヌクレオチド(9-mer)に、フルオレセイン発光団を有するヌクレオチドを化学合成法で、または酵素化学法で結合し合成可能である。

【0033】本発明においては、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、使用の目的に応じて選択可能であり、特に制限されない。

【0034】(FRET現象の測定、蛍光スペクトル測定)本発明においては、FRET現象の有無により、2種類の発光団からの蛍光スペクトル及びその変化を測定し、比較する方法については特に制限はない。

【0035】例えば、FRETが可能ない条件においての2種類の発光団からのそれぞれの蛍光強度の比と、D

FRETが生じない条件下での2種類の発光団からの蛍光強度の比を比較する方法は好適に使用可能である。

【0036】この場合、さらに高感度の測定とするために、励起波長の選択、蛍光の選択的測定のためのフィルター、さらに2種類の蛍光を同時に測定する手段等が好適に使用可能となる。また、本発明に係る方法で使用する蛍光スペクトル測定装置は特に制限はなく、通常の装置が好ましく使用され得る。

【0037】(本発明に係る方法のいくつかの応用例)本発明に係る、FRETを生じる2種類の蛍光色素を両末端に結合させ、溶液中で分子内ハイブリダイズしてヘアピン構造を有する核酸分解酵素活性測定プローブを基質として用い、分光学的方法により特定の核酸分解酵素活性を測定する方法は例えば以下のような場合に適用可能である。

【0038】(1)大腸菌やウイルスなど、微生物はその種類により保持する制限酵素の種類が決まっているので(例えば表1)、有害微生物や病原菌も種類を同定するスクリーニング法として簡便な手段となる。

【0039】(2)一種類の基質を混合するのみで、蛍光強度が大きく変化するため、簡便かつ短時間、高感度の核酸分解酵素活性の測定方法に適用可能である。

【0040】(3)蛋白質、核酸等の他の生体成分が混在する中でも分解酵素活性を測定可能であるため、分解酵素の分離、精製過程が不要となり、蛍光の測定のための被検査試料の前処理が簡単となる。また、細胞内にプローブを導入することにより生きている生体試料での酵素活性が測定可能となる。

【0041】

【作用】すなわち、本発明に係る核酸分解酵素の活性の測定法で用いるプローブは、図2に示されるように、1種類の1本鎖オリゴヌクレオチドプローブであって、少なくとも、(1)FRET現象を利用するための1組のD及びAを該オリゴヌクレオチドの末端部に有し、かつ(2)該プローブが分子内で2本鎖構造を形成する際に、被測定核酸分解酵素の酵素反応認識部としての塩基配列部を形成するような特定の塩基配列を有するものである。さらに、(3)係るD及びAは、該プローブが分子内で2本鎖構造を形成する際にはDからAへのFRETが可能となるような空間位置をとりうるものである。

【0042】分子内でハイブリダイズ体を形成した上記構造を有するプローブは、被測定核酸分解酵素反応により、上記の特定の酵素反応認識部で切断された場合は、図2に示されるように、D又はAが結合している切断された部分はもはや十分ハイブリダイズできず、溶液中に遊離する。従って、FRET現象は消失することとなる。

【0043】オリゴヌクレオチドの5'および3'末端を2種類の異なる蛍光色素(エネルギー供与体と、エネルギー受容体)でラベルし、これらの2種類の発光光

団による分子内での蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に基づく蛍光特性を比較することにより、該オリゴヌクレオチドの分解活性を測定可能とする。

#### 【0044】

【実施例】以下、本発明を実施例に従って詳細に説明する。ただし、本発明はこの実施例に制限されるものではない。

【0045】(実施例1) PvuIIプローブ、HindIIIプローブの調整

化学合成法により以下の塩基配列を有し、3'末端にエネルギー供与体としてのフルオレセインを結合し、5'末端にアミノ基を結合したオリゴヌクレオチドを合成した。このアミノ基にローダミンXイソチオシアネートを反応させることにより、当該オリゴヌクレオチドの5'末端にローダミンXを結合させた。得られたプローブは高速液体クロマトグラフにより精製した。

【0046】PvuIIプローブ：制限酵素PvuIIの認識塩基配列CAGCTをその一部分に有し、かつ5'末端にはエネルギー供与体(色素)としてのフルオレセインが、また3'末端にはエネルギー受容体(色素)としてローダミンXを結合した以下の33mer。

【0047】5'-TTTTCAGCTGGGGTAGATCCCCAGCTGAAAA-3' (ここで下線で示した部分が制限酵素PvuIIの認識塩基配列を示す)。

【0048】HindIIIプローブ：制限酵素HindIIIの認識塩基配列AAGCTTをその一部分に有し、かつ5'末端にはエネルギー供与体(色素)としてのフルオレセインが、また3'末端にはエネルギー受容体(色素)としてローダミンXを結合した以下の33mer。

【0049】5'-TTTAAAGCTTGGGGTAGATCCCCAAGCTTAAAA-3' (ここで下線で示した部分が制限酵素HindIIIの認識塩基配列を示す)。

【0050】蛍光スペクトルは蛍光分光光度計日立モデル850を使用した。

【0051】(実施例2) PvuIIプローブと種々の制限酵素との反応

制限酵素PvuIIが及ぼすPvuIIプローブの蛍光スペクトルへの影響を調べた。20nMのPvuIIプローブと2単位のPvuII(宝酒造(株)より購入)とを10mM TrisHCl (pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、50mM NaClの成分からなる反応液の中で25℃で反応させた(酵素の単位、すなわち活性については宝酒造(株)の製品資料に準じた)。3時間後、波長492nmの光により励起するときの蛍光スペクトルを蛍光光度計を用いて測定し、その結果を図6に示した。コントロール実験として、酵素を含まない溶液で同様の処理を行った。コントロール溶液からの蛍光スペクトルでは、供与体に起因するピーク波長518nmの蛍光はほとんど認められず、FRETが生じていることが認められた(図6ではcontrolとして示されている)。

【0052】他方、PvuIIを含む溶液では供与体の蛍光

が著しく増加した(図6でPvuIIとして示されている)。これは、PvuIIの存在によるFRETの解消(消失)を意味し、酵素がPvuIIプローブを分解(切断)したことを示すものである。

【0053】上記の変化が、制限酵素の認識配列に特異的なものであることを種々の制限酵素を用いて確認した。使用した制限酵素は以下の表1に示した(宝酒造(株)より購入)。

#### 【0054】

表1

制限酵素	認識塩基配列
=====	
PvuII	-CAGCTG-
	-GTCGAC-
HindIII	-AAGCTT-
	-TTTCGA-
AluI	-AGCT-
	-TCGA-
SacI	-GAGCTC-
	-CTCGAG-
=====	

HindIIIとSacIの認識配列はPvuIIプローブに挿入した認識配列両端の塩基配列において異なるので、これら2種類の制限酵素はPvuIIプローブを切断できない。しかし、AluIの認識配列はPvuIIの認識配列の内部4塩基AGCTと同じであるためにPvuIIプローブを切断可能となる。

【0055】それぞれの酵素2単位を20nM PvuIIプローブに反応させて、25℃で2時間放置した後、蛍光スペクトルを測定し、結果を図6に示した。用いた反応溶液は、SacIとAluIに対しては10mM TrisHCl (pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTTからなり、HindIIIとPvuIIに対しては10mM TrisHCl (pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、50mM NaClからなる。実験の結果、HindIIIとSacIの添加は、酵素を添加しなかったコントロールの実験結果と同様の蛍光スペクトルを示し、供与体色素の蛍光強度を変化させなかったが(図6中、HindIIIと、SacIで示されている)、AluIの添加は、PvuIIと同様に、供与体の蛍光強度の著しい増加を引き起こした(図6でAluIで示されている)。

これらの蛍光スペクトルから、波長518nmと609nm(受容体色素の蛍光ピーク波長)における蛍光強度の比を計算し、それぞれの酵素における蛍光強度の比として図7に示した。ここで、酵素を添加していないコントロール、HindIII、及びSacIの低い値に対して、PvuIIとAluIの比が著しく高いことが明らかである。従って、PvuIIプローブの切断(分解)が制限酵素(二本鎖核酸分解酵素)の認識配列に特異的であることを示している。

【0056】(実施例3) HindIIIプローブと種々の制限酵素との反応

制限酵素に認識配列特異的な切断はPvuIIに対するプローブに限定されることなく、他の制限酵素の認識配列を



持つプローブでも可能であることを調べるために、PvuIIプローブの認識配列をHindIIIが認識する塩基配列に変更したHindIIIプローブを用いて酵素反応の蛍光測定実験を行った。HindIIIプローブの塩基配列は上で示したように、5'-TTTAAAGCTTGGGTAGATCCCAAGCTTAAAA-3'（ここで下線で示した部分が制限酵素HindIII認識配列）である。表1に示したそれぞれの制限酵素2単位を20nMのHindIIIプローブと反応させ、実施例2に示したそれぞれの溶液中で2時間反応させた後に、492nmの光で励起して蛍光スペクトルを測定し、図8にその結果を示した。得られたスペクトルから518nmと609nmの蛍光強度の比を求め図9に示した。HindIIIプローブは、HindIIIとAluIの添加で蛍光強度比を増加させたが、PvuIIとSacIの添加では制限酵素を添加していないコントロールと同じ低い値を示した。この結果は、AluIはHindIIIの認識配列の中央の配列を認識し切断したが、PvuIIとSacIの認識配列はHindIIIプローブを切断できなかったことを示すものである。

【0057】（実施例4）FRET供与体（色素）と受容体（色素）で両端を標識した本発明に係るプローブを用いる核酸分解酵素活性の測定方法は、測定対象を制限酵素限らず、塩基配列に特異的でない二本鎖核酸酵素にも適用可能であることを、二本鎖DNA分解酵素BAL31nuclease（以下BAL31とする）を用いて確認した。

【0058】PvuIIプローブとHindIIIプローブそれぞれを最終濃度20nMになるように2単位のBAL31を含む緩衝液に溶解した。緩衝液の成分は20mM TrisHCl (pH8.0)、12mM CaCl<sub>2</sub>、12mM MgCl<sub>2</sub>、0.6M NaCl、1mM EDTAである。室温（25℃）で2時間放置した後、波長490nmで励起して蛍光スペクトルを測定し、その結果を図10に示した。

【0059】両方のプローブにおいて、BAL31処理により明らかに蛍光スペクトルの変化が観測された。波長518nmと609nmでの蛍光強度の比は、PvuIIプローブにおいて、酵素処理前の0.69から処理後の7.73と11.2倍に増加し、HindIIIプローブにおいて、処理前の0.57から処理後の6.88と12.1倍に増加した。この結果は本発明に係るプローブのFRET測定による分解酵素活性の測定方法が、制限酵素に限定されずに、塩基配列に依存しない二本鎖核酸分解酵素にも有効に適用可能であることを示す。

【0060】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列の特徴：5'末端にフルオレセインが結合し、3'

末端にローダミンXが結合

配列

TTTTCAGCTG GGGGTAGATC CCCAGCTGA AAA 33

配列番号：2

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

10 配列の特徴：5'末端にフルオレセインが結合し、3'末端にローダミンXが結合

配列

TTTAAAGCTT GGGGTAGATC CCCAAGCTTA AAA 33

【図面の簡単な説明】

【図1】FRET現象を利用した1組2本のオリゴヌクレオチドからなるプローブの従来例を模式的に示す図である。

【図2】本発明に係るプローブ（図2（A））が、分子内でハイブリダイズしてヘアピン構造をとるためにFRET現象が生じ（図2（B））、二本鎖核酸分解酵素により、核酸分解酵素認識配列が切断され、FRET現象が消失すること（図2（C））を模式的に示す図である。

【図3】本発明に係るプローブの蛍光スペクトルが、核酸分解酵素で処理することによるFRET現象の消失に基づき変化することを示す図である。

【図4】本発明に係るプローブの一例を示すものであり、（A）は2種類の核酸分解酵素認識配列部（それぞれ1、2の認識配列として示されている）を有するプローブであり、（B）は3種類の核酸分解酵素認識配列部（それぞれ1、2、3の認識配列として示されている）を有するプローブを模式的に示す図である。

【図5】3種類の核酸分解酵素認識配列部（それぞれ制限酵素1、2、3の認識配列として示されている）を有する本発明に係るプローブの、制限酵素による切断を模式的に示す図である。

【図6】制限酵素（PvuII、HindIII、SacI、AluI）で処理したPvuIIプローブの蛍光スペクトル変化を示す図である。

40 【図7】制限酵素（PvuII、HindIII、SacI、AluI）で処理したPvuIIプローブの波長518nmと609nmにおける蛍光強度の比を示す図である。

【図8】制限酵素（PvuII、HindIII、SacI、AluI）で処理したHindIIIプローブの蛍光スペクトル変化を示す図である。

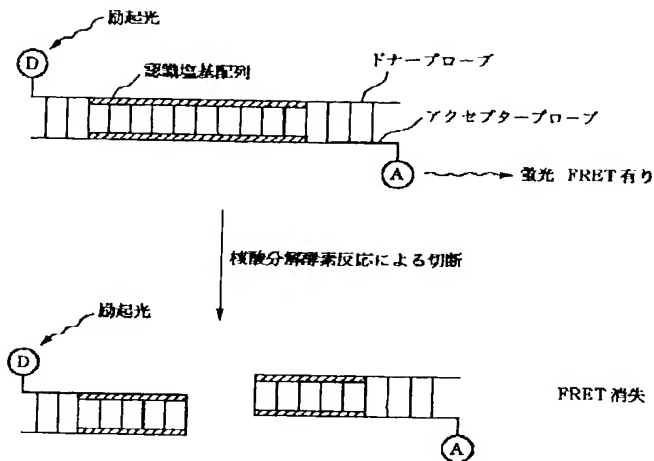
【図9】制限酵素（PvuII、HindIII、SacI、AluI）で処理したHindIIIプローブの波長518nmと609nmにおける蛍光強度の比を示す図である。

50 【図10】二本鎖核酸分解酵素BAL31によるプローブ（PvuIIプローブ及びHindIIIプローブ）の蛍光スペクトル

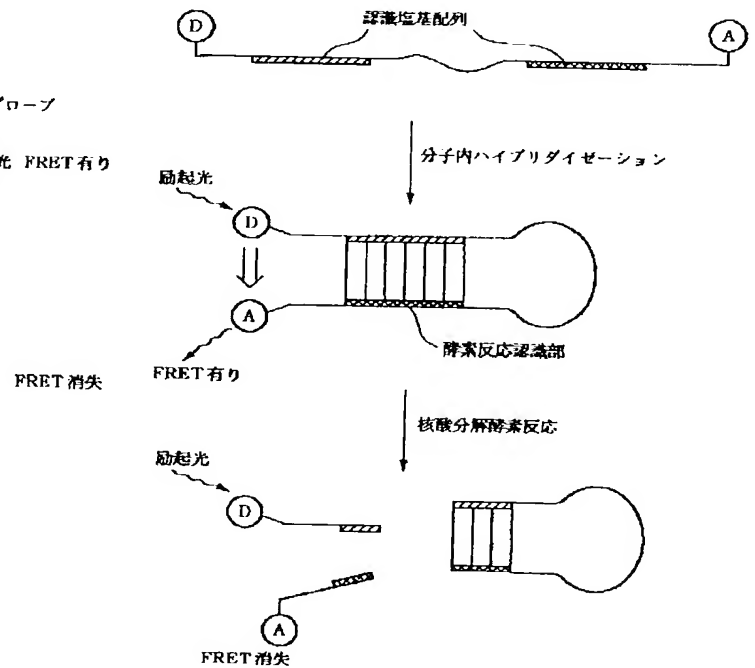


変化を示す図である。

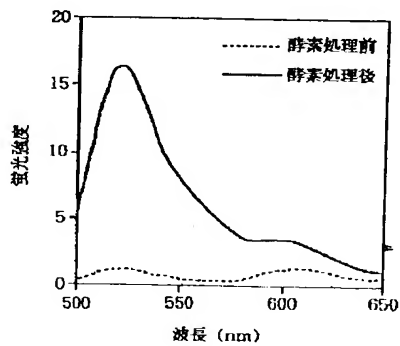
【図1】



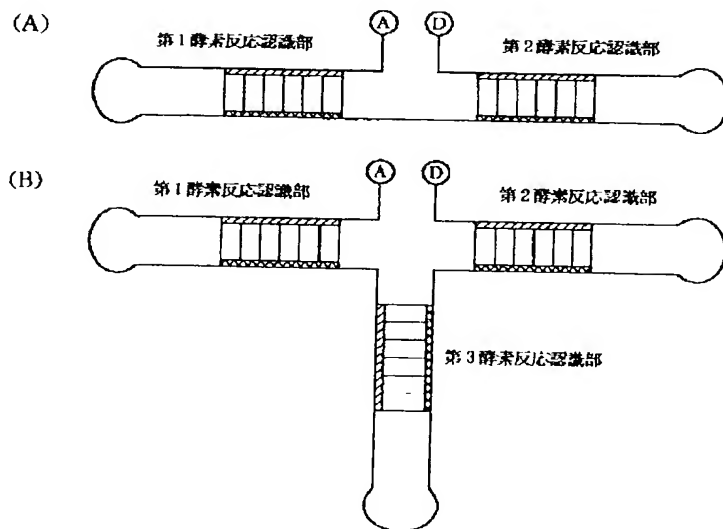
【図2】



【図3】



【図4】



【図6】

